

УДК 616.153.915
©Яковлев, Гуляева

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИОЛОВЫХ ГРУПП В ТКАНИ МОЗГА ПРИ ПОМОЩИ THIOGLO-1

А.А. Яковлев^{1,2}, Н.В. Гуляева¹

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
ул. Бултерова 5а, 117865 Москва, тел.: (095)9524007; факс: (095)9524007

²Московский физико-технический институт, Институтский пер. 9,
141700 Долгопрудный Московской обл.

Описан флуориметрический метод определения содержания белковых и небелковых SH-групп в образцах мозга при помощи коммерчески доступного реагента ThioGlo-1. Изучены сравнительные характеристики двух методов определения содержания SH-групп в биологическом материале: наиболее часто используемый метод с применением реактива Элмана и метод с ThioGlo-1. Последний отличается высокой чувствительностью и простотой. В отличие от большинства используемых методов, позволяющих определить содержание SH-групп в супернатантах, данный метод позволяет использовать для этих целей также и гомогенаты.

Ключевые слова: тиоловые (SH) группы, GSH, реактив Элмана, ThioGlo-1.

ВВЕДЕНИЕ. Трипептид глутатион (GSH, γ -L-глутамил-L-цистеинилглицин) является одним из важнейших низкомолекулярных клеточных компонентов, содержащих SH-группы и присутствует в клетках млекопитающих в концентрации до 12 мМ. В организме GSH имеет ряд физиологических функций, в первую очередь, связанных непосредственно с защитой клетки от активных форм кислорода (АФК) [1]. GSH вовлечен как в прямые ферментативные реакции со свободными радикалами [2], так и в качестве донора электронов в реакции восстановления пероксида, катализируемой глутатионпероксидазой [3]. АФК постоянно генерируются в процессе метаболизма, достигая в мозге высокой концентрации. Показано, что АФК способны вызывать перекисное окисление липидов, модифицировать белки, вызывать разрывы ДНК [4]. В связи с этим детоксикация АФК является одним из важнейших условий нормального функционирования головного мозга, и антиоксидантная роль GSH в этом процессе очень важна. GSH составляет большую часть низкомолекулярных тиолов в клетках мозга. Кроме этого, GSH осуществляет функции, не связанные с антиоксидантной защитой клетки, например, опосредует клеточную пролиферацию и апоптоз [5].

Белковые SH-группы также важны для функционирования клетки. При окислении SH-групп остатков цистеина в составе белков формируются дисульфидные мостики [6]. Окисление SH-групп белков приводит к изменению, в том числе нарушению, свойств многих белков, важных для функционирования клетки.

Значение тиолов, в первую очередь GSH, для нормального функционирования организма стимулировало развитие методов определения GSH и других биологически активных тиолов в различных тканях [7-9]. Для определения SH-групп в биологическом материале разработан ряд методов,

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП

каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Наиболее широко распространенным методом определения тиолов в тканях до сих пор является спектрофотометрический метод, основанный на использовании 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) (DTNB), предложенный Элманом в 1959 году [7]. Преимущества этого метода заключаются в быстроте и хорошей воспроизводимости, а главные недостатки связаны с недостаточной чувствительностью.

Гораздо более чувствительны методы, использующие для детектирования SH-групп флуоресцентные красители [9]. В последнее время появился новый реагент для определения тиогрупп ThioGlo-1, обладающий рядом преимуществ и разработанный в первую очередь для использования при высокоэффективной жидкостной хроматографии [10]. ThioGlo-1 является малеимидным производным нафтопиранонового флуорофора. ThioGlo-1 реагирует как с GSH, образуя флуоресцирующее соединение в течение нескольких секунд, так и с SH-содержащими белками (при этом реакция может проходить в течение нескольких часов). Флуоресценция продукта реакции ThioGlo-1 с SH-группами примерно в 50 раз выше, чем фоновая флуоресценция ThioGlo-1 до реакции с SH-содержащими веществами.

Целью работы являлась сравнительная характеристика двух методов измерения концентрации тиолов в мозге, определение диапазонов применимости и чувствительности этих методов. Исследовали также возможность определения SH-групп с помощью ThioGlo-1 как в супернатантах, так и в гомогенатах мозга.

МЕТОДИКА. В работе использовали взрослых крыс-самцов линии Wistar массой 220-280 г. Животных содержали в виварии в естественных условиях освещения при свободном доступе к воде и пище.

Животное декапитировали, при постоянном охлаждении на льду из мозга быстро выделяли кору больших полушарий, образцы ткани хранили в жидком азоте. Ткань гомогенизировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4, 1:5 (вес:объем) в гомогенизаторе Potter S со скоростью 1500 об/мин в течение 1 мин. Полученный гомогенат разделяли на две части, одну замораживали при -40°C, другую часть центрифугировали при 13000g в течение 30 мин при +4°C и отбирали супернатанты, которые хранили также при -40°C. Концентрацию белка в образцах определяли по методу Bradford с использованием красителя Кумасси голубого [11].

SH-группы определяли по методу Элмана [7] в модификации Sedlak and Lindsay [12]. Вначале определяли общее содержание SH-групп в образцах. Для этого пробы инкубировали 30 мин в темноте в присутствии 1 мМ DTNB и 17,3 мМ (0,5 %) додецилсульфата натрия (SDS). Конечная концентрация белка в пробах объемом 1 мл составляла 200-300 мкг/мл. Затем с помощью спектрофотометра LKB Ultrospec 4050 измеряли оптическую плотность при 412 нм. Из полученных значений вычитали оптическую плотность образца с SDS и оптическую плотность DTNB и SDS в отсутствие биологического материала. Концентрацию SH-групп рассчитывали, исходя из известного коэффициента молярной экстинкции $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Для определения содержания небелковых SH-групп пробу тщательно смешивали с охлажденной 5 %-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и оставляли на льду на 15 мин, затем центрифугировали при 11000 g 5 мин при +4°C. Отобранный супернатант нейтрализовали с помощью 1 %-ного NaOH и инкубировали с 0,1 мМ DTNB в темноте 30 мин. Содержание небелковых SH-групп определяли по оптической плотности при 412 нм и рассчитывали на мг белка.

Определение концентрации белковых и небелковых SH-групп проводили также с помощью флуоресцентного красителя ThioGlo-1 (Calbiochem), используя собственную модификацию метода, предложенного Tyurin et al. [13]. Для определения содержания небелковых SH-групп пробы, концентрация белка в которых была доведена до 15-50 мкг/мл, инкубировали в течение 5 мин на льду с ThioGlo-1, конечная концентрация которого составляла 10 мкМ. Затем с помощью флуориметра Hitachi F-3000, оборудованного микрокюветой объемом 200 мкл,

регистрировали флуоресценцию при длинах волн возбуждения и эмиссии 388 и 500 нм соответственно. Калибровочную кривую строили по флуоресценции восстановленного GSH (12,5-500 нМ, "Sigma") в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) в присутствии 10 мкМ ThioGlo-1. Затем в пробу добавляли SDS до конечной концентрации 2 мМ и тщательно смешивали на шейкере в течение 1 мин. Пробы инкубировали при комнатной температуре 15 мин, после чего оценивали уровень общих SH-групп по флуоресценции при тех же значениях длин волн. В предварительных экспериментах было установлено, что SDS влияет только на фоновую флуоресценцию, не влияя на флуоресценцию продукта взаимодействия SH-групп и ThioGlo-1. Содержание SH-групп вычисляли по калибровочной кривой. ThioGlo-1, хранили при +4°C в виде 10 мМ раствора в ДМСО. Непосредственно перед экспериментом реагент разводили до концентрации 20 мкМ в 50 мМ фосфатном буфере (в таком виде реагент стабилен на льду в течение нескольких часов). Раствор восстановленного GSH готовили на фосфатном буфере ежедневно, в течение дня хранили на льду.

Для проверки валидности двух методов определения SH-групп в мозге измеряли содержание SH-групп фермента алкогольдегидрогеназы (АДГ, "Serva"). Фермент растворяли в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,4 до различных концентраций и измеряли содержание SH-групп двумя методами как описано выше. Концентрацию АДГ измеряли спектрофотометрически, исходя из коэффициента экстинкции, $\epsilon(1\%)=14,6$ при длине волны 280 нм [14]. Калибровочную кривую для метода с использованием ThioGlo-1 строили по цистеину ("Serva").

Вычисления и построение графиков проводили в программе "Statistica for Windows 5.1" Представленные в настоящей работе результаты являются средним двух независимых определений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Чувствительность и диапазон применения двух методов определения SH-групп определяли при измерении концентрации восстановленного GSH (рис. 1 и рис. 2). Из данных, представленных на рисунках 1 и 2, видно, что для метода с использованием DTNB линейная зависимость оптической плотности от концентрации GSH наблюдается в диапазоне от 5 до 100 мкМ, а для метода с использованием ThioGlo-1 - от 12,5 до 500 нМ. В этих же экспериментах установлено, что чувствительность метода с ThioGlo-1 превосходит чувствительность метода Элмана примерно в сто раз, поскольку минимально регистрируемым количеством GSH в первом случае является около 2,5 пмоль, тогда как во втором - около 0,25 нмоль. Такая существенная разница в чувствительности позволяет с использованием ThioGlo-1 регистрировать содержание тиолов в мелких структурах мозга в том случае, когда чувствительности стандартного метода с использованием реактива Элмана недостаточно.

Линейность в большем диапазоне концентраций GSH специально исследована не была, поскольку приведенного диапазона достаточно для осуществления большинства экспериментальных задач.

В одной из серий экспериментов было проведено сравнение содержания растворимых SH-групп в супернатантах коры больших полушарий мозга крыс, измеренное с помощью методов с использованием реактива Элмана и ThioGlo-1, причем в методе с ThioGlo-1 в двух модификациях. Образцы либо сначала депротенизировали, а затем разводили до нужной концентрации (способ 1), либо вначале разводили, а затем депротенизировали (способ 2). В депротенизированных пробах концентрацию SH-групп рассчитывали на исходное содержание белка. В обоих случаях растворы нейтрализовали NaOH, используя отработанные заранее соотношения для получения pH 7,4. Затем добавляли ThioGlo-1 и измеряли флуоресценцию. Результаты, представленные в таблице 1, указывают на отличия полученных результатов для двух модификаций метода с ThioGlo-1. Значения, полученные с помощью способа 2, соответствуют

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП

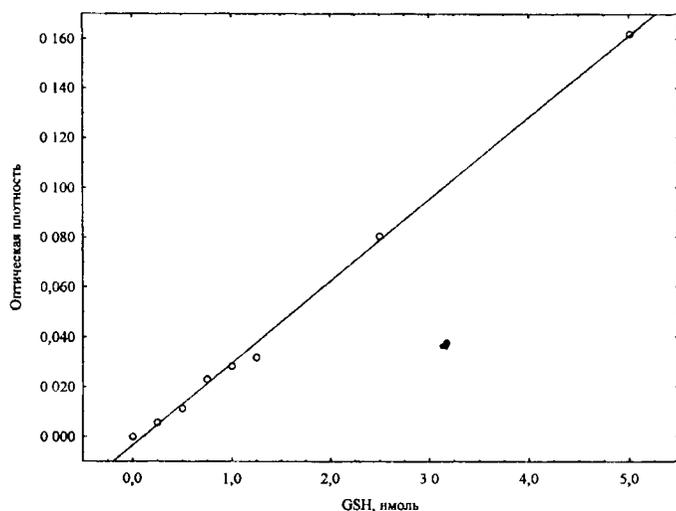


Рисунок 1.

Стандартная кривая для оптической плотности продукта реакции GSH с DTNB.

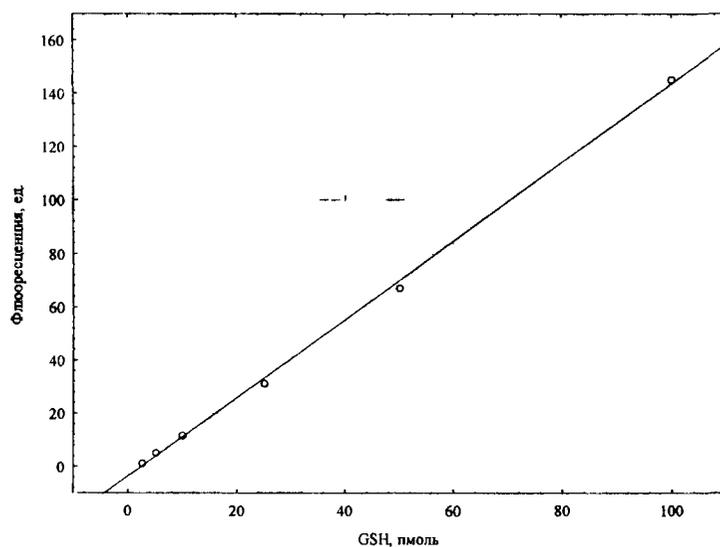


Рисунок 2

Стандартная кривая флуоресценции продукта реакции GSH с ThioGlo-1.

таковым по методу Элмана, в то время как значения, полученные по способу 1, существенно отличаются. Полученные методом Элмана и методом с ThioGlo-1 (способ 2) близки к значениям, приводимым другими исследователями. По данным литературы, содержание GSH в супернатантах составляет около 10 нмоль/мг белка и не зависит существенно от метода определения [15, 16].

Из полученных результатов видно, что следует выбирать модификацию метода ThioGlo-1 без предварительной депротеинизации. При этом, тщательно придерживаясь схемы обработки проб по способу 2 методом с ThioGlo-1, могут быть получены результаты, удовлетворительно согласующиеся с данными, полученными с использованием метода Элмана и с данными литературы [15, 16].

Таким образом, два различных метода определения концентрации GSH дают сходные результаты. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о возможности использования метода ThioGlo-1 для определения тиолов в супернатантах гомогенатов мозга крыс.

Таблица 1. Содержание растворимых SH-групп, измеренное разными методами в супернатантах коры больших полушарий мозга крыс, нмоль/мг белка

Образец	Метод Элмана	ThioGlo-1 (способ 1)	ThioGlo-1 (способ 2)
1	10,99	1,33	11,84
2	10,03	53,31	9,47
3	8,85	51,07	8,85

Для определения содержания белковых и небелковых SH-групп можно предложить модификацию метода ThioGlo-1, которая не требует предварительного осаждения белков. К тому же данная модификация дает возможность измерять содержание как белковых, так и небелковых SH-групп в одной и той же пробе, позволяя в некоторых случаях существенно экономить биологический материал. Эта модификация использует временную разницу протекания реакции ThioGlo-1 с растворимыми и белковыми SH-группами. Характерным временем протекания реакции ThioGlo-1 с GSH можно считать минуты, а с белковыми SH-группами - десятки минут.

Типичная зависимость флуоресценции ThioGlo-1 от времени при добавлении биологического материала, а затем SDS, представлена на рисунке 3. Вначале в кювету при комнатной температуре добавляли ThioGlo-1 и давали установиться определенному уровню фоновой флуоресценции в отсутствие тиолов. Затем в кювету добавляли образец, содержащий SH-группы, и тщательно перемешивали. В течение следующих нескольких минут уровень флуоресценции фактически не изменялся. Вычитание фона из этого уровня дает флуоресценцию продукта реакции GSH с ThioGlo-1. Можно предполагать, что в отсутствие детергента за это время белковые SH-группы в растворе в реакцию не вступают. По истечении нескольких минут и после выхода флуоресценции на плато, добавляли SDS. Флуоресценция после этого значительно увеличивалась. Ее уровень продолжал возрастать, после чего также достигал определенного максимального стабильного значения. Это значение отражает общее содержание SH-групп в растворе. Следует отметить, что наблюдается постоянный незначительный дрейф флуоресценции в сторону увеличения, который может быть связан с медленным вовлечением в реакцию незначительного числа наиболее труднодоступных белковых SH-групп. В связи с незначительностью такого дрейфа его величиной можно пренебречь и считать, что практически все белковые тиолы прореагировали за 15 мин.

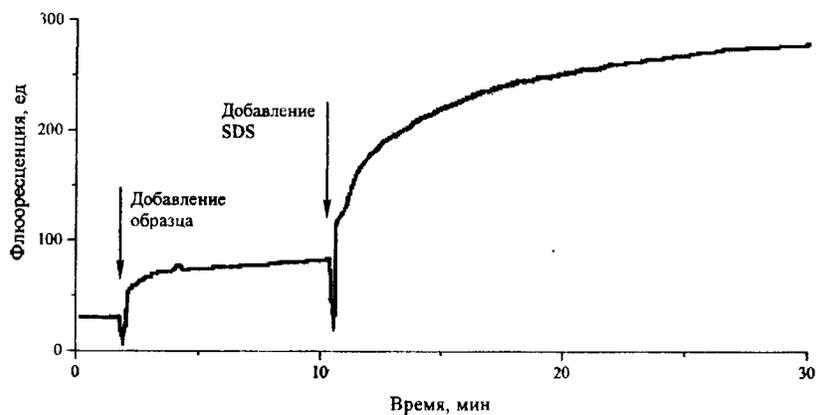


Рисунок 3.

Зависимость флуоресценции продукта реакции GSH с ThioGlo-1 от времени.

Оба метода были использованы для определения белковых SH-групп в составе АДГ. Зависимости оптической плотности или флуоресценции продукта реакции от концентрации АДГ представлены на рисунках 4 и 5. Расчет числа тиоловых групп на молекулу АДГ в методе Элмана проводили по коэффициенту наклона прямой на рисунке 4, исходя из известного коэффициента экстинкции;

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП

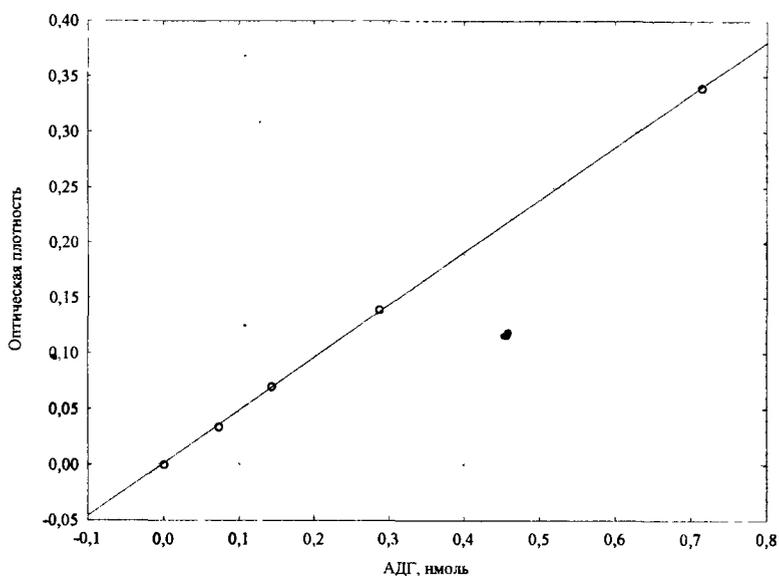


Рисунок 4.

Зависимость оптической плотности продукта реакции АДГ с DTNB через 30 мин инкубации от количества АДГ.

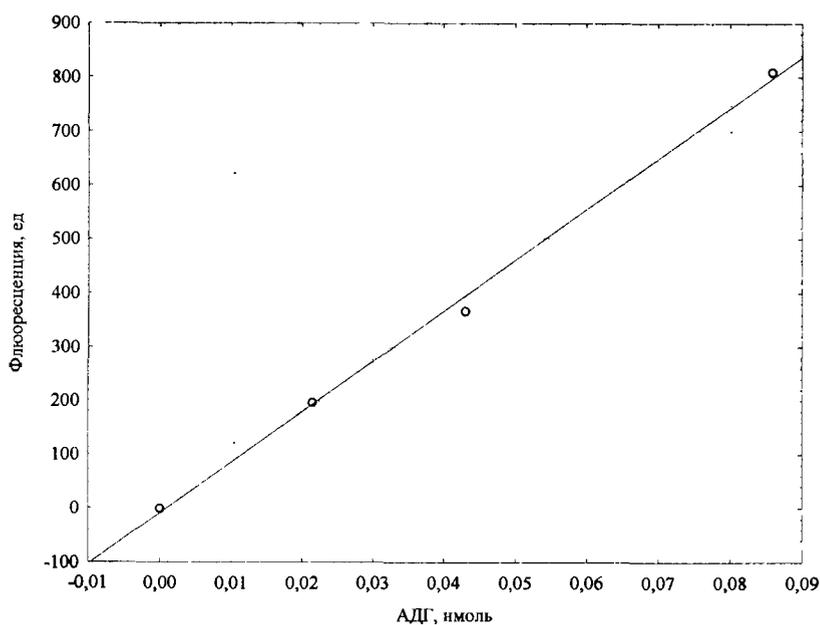


Рисунок 5.

Зависимость флуоресценции продукта реакции АДГ с ThioGlo-1 через 20 мин инкубации от количества АДГ.

Этот метод выявил $21,0 \pm 0,1$ SH-групп на молекулу белка. В методе с использованием ThioGlo-1 число тиоловых групп на молекулу АДГ определяли, исходя из флуоресценции продукта реакции цистеина, содержащего 1 SH-группу на молекулу, и ThioGlo-1. В этом методе расчетное значение составило $22,8 \pm 0,6$ SH-групп на молекулу АДГ. По данным литературы, молекула АДГ содержит от 20 до 26 SH-групп [14, 17]. Полученные нами результаты позволяют с большой вероятностью утверждать о применимости метода ThioGlo-1 для определения белковых SH-групп.

С учетом вышеперечисленных допущений было измерено содержание GSH и белковых SH-групп в гомогенатах коры больших полушарий мозга крыс с помощью ThioGlo-1, и результаты были сравнены с результатами, полученными по методу Элмана. В таблице 2 представлены сравнительные результаты этих экспериментов. Измеренная двумя способами концентрация GSH практически не отличается (хотя по методу Элмана не удалось измерить содержание GSH в одной из проб, возможно, в связи с его недостаточной чувствительностью). Таким образом, два разных метода измерения содержания GSH в мозге дают одинаковые результаты. И в гомогенатах, и в супернатантах классический метод Элмана выявляет сходные с методом ThioGlo-1 значения. По данным литературы, гомогенаты и супернатанты коры больших полушарий содержат десятки наномолей GSH на мг белка, причем сходные данные получены разными методами [18, 19]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о применимости и существенных преимуществах метода ThioGlo-1 при определении концентрации GSH в мозге.

Таблица 2. Содержание растворимых и общих SH-групп в гомогенатах коры больших полушарий крыс, измеренное разными методами, нмоль/мг белка.

Образец	Метод Элмана		ThioGlo-1	
	растворимые	общие	Растворимые	общие
1	0	148,3	29,1	74,4
2	26,4	185,3	24,2	67,8
3	16,7	122,9	25,7	65,2

Существенное различие между двумя методами обнаружено при измерении содержания общих SH-групп в гомогенатах коры больших полушарий мозга (табл. 2). При этом метод Элмана дает значения, примерно вдвое превышающие таковые с ThioGlo-1. Данные литературы свидетельствуют, что определяемое с помощью метода Элмана содержание белковых SH-групп в гомогенатах мозга составляет около 100 нмоль/мг белка [20, 21], и полученные нами результаты с этим согласуются. С другой стороны, более низкий уровень определяемых с ThioGlo-1 тиолов в гомогенатах может лишь в незначительной степени быть обусловлен неполной реакцией со скрытыми белковыми SH-группами в сравнении с методом Элмана, при реализации которого концентрация SDS намного выше. Однако в предварительных экспериментах нами была установлена минимальная концентрация SDS, обеспечивающая максимальную реакцию ThioGlo-1 с тиолами (т.е. дальнейшее повышение концентрации SDS не приводило к увеличению флюоресценции относительно фоновых значений). Более вероятным представляется возможность некоторого завышения уровня белковых тиолов при определении традиционным методом.

Значения концентрации GSH, получаемые при измерении в гомогенатах мозга с ThioGlo-1, в 2,5-3 раза превосходят значения, получаемые в супернатантах (табл. 1, 2), что подтверждает результаты, полученные другими исследователями при использовании других методов (в 1,5 - 3 раза) [15, 16, 19]. Эти различия могут свидетельствовать о том, что в гомогенате присутствуют легкодоступные SH-группы, которые, тем не менее, остаются в осадке при центрифугировании (т.е., могут быть связаны с определенными клеточными структурами). Доля таких групп среди всех растворимых SH-групп составляет примерно половину. Таким образом, и более высокие уровни растворимых SH-групп в гомогенатах по сравнению с супернатантами адекватно регистрируются с помощью метода ThioGlo-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. В данной работе проведено сравнение нового метода определения содержания биологических тиолов с использованием ThioGlo-1 с классическим методом Элмана. Установлен диапазон применимости нового метода, предложен также диапазон линейной калибровки данных по

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП

восстановленному GSH, установлена применимость метода для определения белковых SH-групп. Выявлены некоторые ограничения: например, необходимость учета влияния этапа депротсинизации, на определяемое значение GSH. Новый метод обладает более высокими чувствительностью, экономичностью и производительностью.

Работа поддержана грантами РФФИ 01-04-49476а и 02-04-06407мас

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dringen R.* (2000) *Prog. Neurobiol.*, **62**, 649-671.
2. *Winterbourn C.C., Metodiewa D.* (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **314**, 284-290.
3. *Chance B., Sies H., Boveris A.* (1979) *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.
4. *Beckman K.B., Ames B.N.* (1998) *Physiol. Rev.*, **78**, 547-581.
5. *Davis W.Jr., Ronai Z., Tew K.D.* (2001) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 1-6.
6. *Pihl A., Lange R.* (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1356-1364.
7. *Ellman G.L.* (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
8. *Katyal J.M., Gorin G.* (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 319-329.
9. *Wright S.K., Viola R.E.* (1998) *Anal. Biochem.*, **265**, 8-14.
10. *Langmuir M.E., Yang J.R., Moussa A.M., Laura R., Lecompte K.A.* (1995) *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3989-3992.
11. *Bradford M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-253.
12. *Sedlak J., Lindsay R.H.* (1968) *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205.
13. *Tyurin V.A., Tyurina Yu.Y., Borisenko G.G., Sokolova T.V., Ritov V.B., et al.* (2000) *J. Neurochem.*, **75**, 2178-2189.
14. *Buhner M., Sund H.* (1969) *Eur. J. Biochem.*, **11**, 73-79.
15. *Hashimoto M., Hossain S., Shimada T., Sugioka K., Yamasaki H., et al.* (2002) *J. Neurochem.*, **81**, 1084-1091.
16. *Folbergrova J., Rehncrona S., Siesjo B.K.* (1979) *J. Neurochem.*, **32**, 1621-1627.
17. *Crow J.P., Beckman J.S., McCord J.M.* (1995) *Biochemistry*, **34**, 3544-3552.
18. *Dogru-Abbasoglu S., Tamer-Toptani S., Ugurnal B., Kocak-Toker N., et al.* (1997) *Mech. Ageing Dev.*, **98**, 177-180.
19. *Cardozo-Pelaez F., Brooks P.J., Stedeford T., Song S., Sanchez-Ramos J.* (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 779-785.
20. *Аскеров Ф.Б., Керимов Б.Ф., Алиев С.А., Гасанова М.А.* (1988) *Известия АН Азерб. ССР*, **2**, 93-98.
21. *Calabrese V., Renis M., Calderone A., Russo A., et al.* (1998) *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1159-1167.

Поступила 28.10.2002

USING THIOGLO-1 FOR THE DETERMINATION OF THIOLS IN BRAIN TISSUE

A.A.Yakovlev^{1,2}, N.V.Gulyaeva¹

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Butlerov Str. 5a,
117865 Moscow, Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology, Institutsky Lane 9, Dolgoprudny, Moscow Region,
141700 Russia

A technique for the fluorometric determination of protein and non-protein thiols in brain tissue with the maleimide reagent ThioGlo-1 is has been described. Comparison with the most popular spectrophotometric Ellman method has been performed. The ThioGlo-1-based method is highly sensitive and may be used for thiol determination both in homogenates and supernatants of brain tissue.

Key words: thiols, GSH, Ellman reagent, ThioGlo-1.